



Patent
0512-1258

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Charles TELLIER et al.

Conf. 3550

Application No. 10/522,161

Group 1609

Filed September 30, 2005

Examiner G. Owens

METHOD FOR MAKING BIOCHIPS

DECLARATION UNDER RULE 131

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

I, Bruno BUJOLI, hereby declare and state:

I am one of the inventors of the above-identified U.S.
patent application.

The attached document, an "Enveloppe Soleau", was
prepared by me.

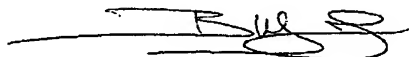
The attached Enveloppe Soleau and work described therein
were completed in France.

The claimed invention of the present application was
completed prior to July 31, 2001, as evidenced by the attached
Enveloppe Soleau. The Enveloppe Soleau, dated April 30, 2001,
describes the claimed invention, and was filed with the French
Patent Office (INPI) on May 9, 2001 to register a date for the
claimed invention.

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under §1001 of Title 18 of the United States code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date November 28, 2007

Bruno BUJOLI

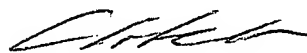


Bruno BUJOLI

Laboratoire de Synthèse Organique - UMR CNRS 6513
FACULTE DES SCIENCES ET DES RECHERCHES
2, rue de la Houssinière - BP 92208
44322 NANTES CEDEX 3
Tél. 02.51.12.54.01 - Fax 02.51.12.54.02

RWS Group Ltd, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England, hereby declares that, to the best of its knowledge and belief, the following document, prepared by one of its translators competent in the art and conversant with the English and French languages, is a true and correct translation of the accompanying document in the French language.

Signed this 13th day of December 2007



C. E. SITCH

Managing Director - UK Translation Division

For and on behalf of RWS Group Ltd



30 April 2001

Covalent attachment of oligonucleotides to glass slides coated with a zirconium phosphonate Langmuir-Blodgett film

Laboratoire de Synthèse organique [Laboratory of organic synthesis] UMR CNRS 6513 (Nantes - Dir JP Pradere)

Bruno BUJOLI (DR CNRS), Pascal JANVIER (MC), Muriel PIPELIER (MC) , Didier DUBREUIL (PR)

Laboratoire de Biocatalyse [Laboratory of biocatalysis], FRE CNRS 2230 (Nantes - Dir C. Tellier)

Charles TELLIER (PR)

University of Florida, Gainesville (USA)

Daniel TALHAM (Professor) Isa BENITEZ (Ph.D. Student)

1 - Objectives and purposes of the project

The objective of this project is to propose a novel method for the ionic-covalent anchoring of oligonucleotides or of cDNA fragments on a glass plate for the fabrication of DNA chips. This technique would make it possible to construct the array by simple deposition by spotting of presynthesized oligonucleotides or of cDNA.

2 - Scientific and technical advantage

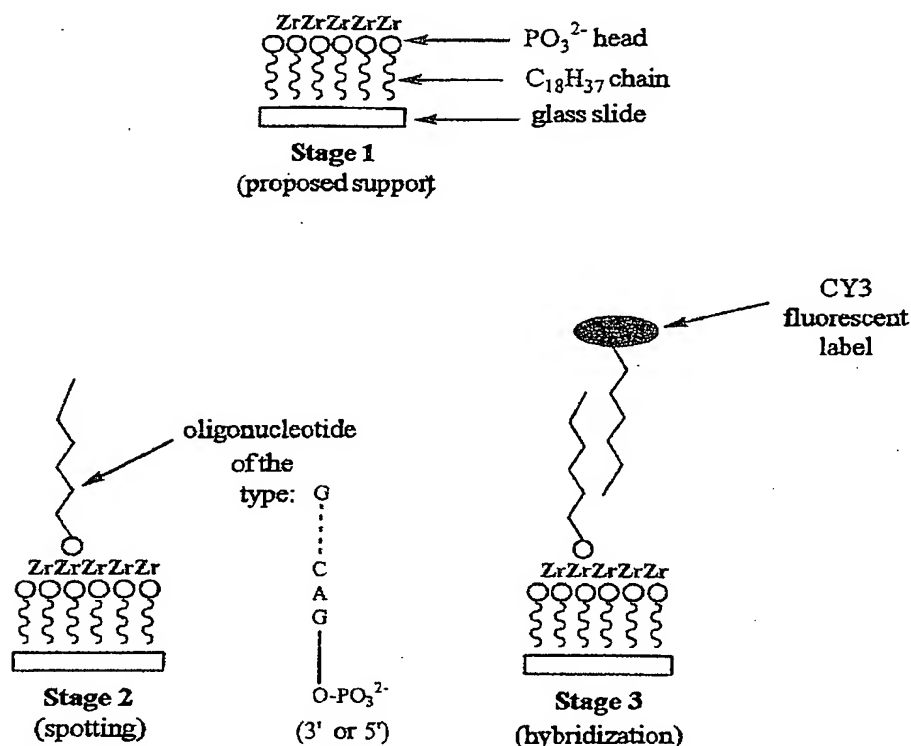
Various methods are used today for the fabrication of DNA chips: either the oligonucleotides are synthesized directly on the support after covalent anchoring of a precursor, or the oligonucleotides are presynthesized, provided with an anchoring means (biotinylation) and then deposited by spotting onto a plate activated with a layer of streptavidin. When the chips consist of cDNA fragments, the latter are most commonly immobilized by adsorption onto a layer of aminosilane or of polylysine. The latter strategy often poses problems of repeatability and surface homogeneity related to the difficulty in controlling the quality of the polylysine film and its stability.

The anchoring technique proposed would be applicable both to synthetic oligonucleotides and to cDNAs. **It ensures anchoring of ionic-covalent type**, which is therefore resistant, and should allow a better control of the density and homogeneity of the anchoring. This anchoring, which involves the phosphate group naturally present on the DNA, **avoids any chemical modification** of the oligonucleotides or cDNA. Furthermore, this technique **does not require the development of a specific apparatus for automation of the fabrication**, since the ionic-covalent anchoring does not use additional reagents and simply involves the deposition by spotting on the glass plate by means of conventional robots already developed for the fabrication of conventional chips.

3 - Description of the project and feasibility

We propose to use our know-how in the field of zirconium phosphonate Langmuir-Blodgett (LB) films to propose a novel method of attachment of oligonucleotides or of cDNA to glass slides. We have previously established that, using octadecylphosphonic acid [$C_{18}H_{37}PO_3H_2$] and zirconium salts, it is possible to deposit even LB films on microscope slides (figure on following page - stage 1). We thus obtain a surface that is metallic in nature, consisting of regularly arranged zirconium atoms; we have noted that this surface is very reactive, in particular with a very high affinity for phosphonic acid groups $[P(O)(OH)_2]$. We have thus shown that, in solution, various molecules bearing these $P(O)(OH)_2$ functionalities are covalently grafted onto this surface (self-assembly). According to this strategy, we have in

particular been able to immobilize manganese porphyrins for preparing catalytic films¹. This study is carried out jointly with the group of Professor Daniel TALHAM (University of Florida, Gainesville, USA) in the context of a CNRS/NSF cooperation agreement (2000-2002).



By analogy with the results described above, we propose, in the context of this project, firstly to graft onto these films oligonucleotides with phosphate endings $[\text{O-P(O)(OH)}_2]$ (in the 5' or 3' position) (figure - stage 2). This will then be followed by a hybridization step with oligonucleotides labelled with a fluorescent probe (figure - stage 3). The deposition will be carried out using a spotter (ESI: Engineering Services Incorporation) and the fluorescence analyses will be carried out using a scanner (GSI Lunomics Inc. Corporation).

A first feasibility study has shown that an oligonucleotide of 24 bases, phosphorylated in the 3' position and labelled in the 5' position with a CY3 fluorescent probe, is spontaneously anchored by simple spotting on our zirconium phosphonate Langmuir-Blodgett films. By

¹ Studies in the process of being published and C.M. NIXON, K. LE CLAIRE, F. ODOBEL, B. BUJOLI and D.R. TALHAM, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 965-976. Palladium porphyrin containing zirconium phosphonate Langmuir-Blodgett films.

comparison with an identical oligonucleotide that is not phosphorylated in the 3' position, it appears that the anchoring onto the film involves the terminal phosphate and that the attachment is stable under standard DNA-chip washing conditions.

The study program envisaged consists in:

- Investigating the optimal spotting and washing conditions for specific anchoring of phosphorylated oligonucleotides.
- Studying the influence of the position of the phosphate in the 3' or 5' position of the oligonucleotide and of the presence or absence of a spacer arm.
- Studying the limits of the stability of this method of anchoring under various hybridization conditions. This type of zirconium phosphonate/phosphate assembly that we propose would, *a priori*, be sufficiently resistant to envisage re-utilization of the support after use, by carrying out an aqueous treatment under hot conditions so as to bring about unpairing.
- Observing, by atomic force microscopy, the quality of the deposits.
- Adapting these spotting conditions to the preparation of chips containing DNAs of larger size (see DNAs). In the context of a collaboration with INSERM unit 533, we will in particular be able to select oligonucleotides corresponding to genes of interest for the study of cardiac pathologies. These genes have differential expressions in various cardiomyopathies. It would be advantageous to develop second-generation chips with relevant genes and more sensitive detection methods with applications in the context of endocavity biopsies that are obtained after heart transplants.



30 Avril 2001

**Accrochage covalent d'oligonucléotides sur lames de verre
revêtues d'un film Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de
zirconium**

Laboratoire de Synthèse Organique UMR CNRS 6513 (Nantes – Dir JP Pradere)
Bruno BUJOLI (DR CNRS), Pascal JANVIER (MC), Muriel PIPELIER (MC), Didier
DUBREUIL (PR)

Laboratoire de Biocatalyse, FRE CNRS 2230 (Nantes – Dir C. Tellier)
Charles TELLIER (PR)

University of Florida, Gainesville (USA)

Daniel TALHAM (Professor) Isa BENITEZ (Ph. D. Student)

1- Objectifs et finalités du projet

L'objectif de ce projet est de proposer une nouvelle méthode d'ancrage iono-covalent d'oligonucléotides ou de fragments d'ADNc sur plaque de verre pour la fabrication de puces à ADN. Cette technique permettrait la construction du réseau par simple dépôt par « spot » d'oligonucléotides présynthétisés ou d'ADNc.

2- Intérêt scientifique et technique

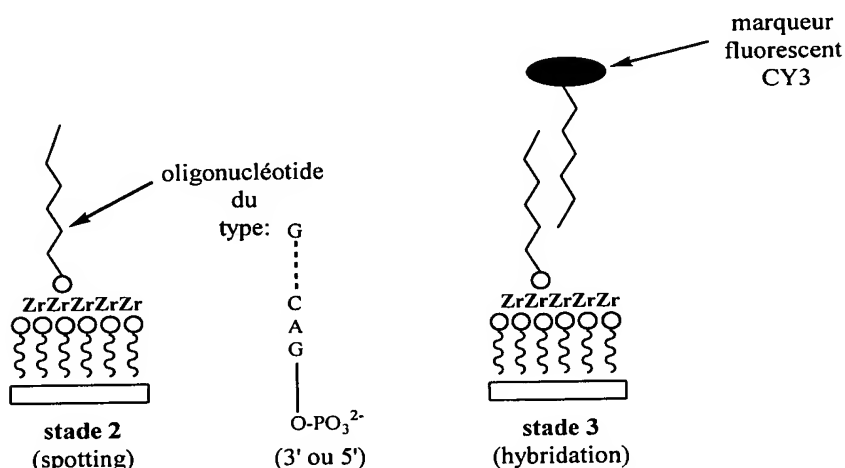
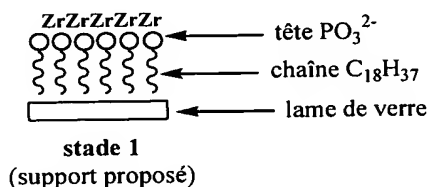
Différents procédés sont aujourd'hui utilisés pour la fabrication de puces à ADN: soit les oligonucléotides sont synthétisés directement sur le support après ancrage covalent d'un précurseur, soit les oligonucléotides sont présynthétisés, munis d'un moyen d'ancrage (biotinylation) et déposés ensuite par spot sur une plaque activée par une couche de streptavidine. Lorsque les puces sont constituées de fragments d'ADNc, ceux-ci sont le plus souvent immobilisés par adsorption sur une couche d'aminosilane ou de polylysine. Cette dernière stratégie pose souvent des problèmes de répétabilité et d'homogénéité de surface liés à la difficulté de contrôler la qualité du film de polylysine et sa stabilité.

La technique d'ancrage proposée serait applicable à la fois sur des oligonucléotides de synthèse et sur des ADNc. **Elle assure un ancrage de type iono-covalent**, donc résistant, et devrait permettre un meilleur contrôle de la densité et de l'homogénéité de l'ancrage. Cet ancrage faisant intervenir le groupement phosphate naturellement présent sur les ADN **évite toute modification chimique** des oligonucléotides ou ADNc. De plus, cette technique **ne nécessite pas le développement d'un appareil spécifique pour l'automatisation de la fabrication**, puisque l'ancrage iono-covalent n'utilise pas de réactifs additionnels et implique simplement le dépôt par « spot » sur une plaque de verre au moyen de robots classiques déjà développés pour la fabrication des puces traditionnelles.

3- Description du projet et faisabilité

Nous nous proposons d'utiliser notre savoir-faire dans le domaine des films Langmuir-Blodgett (LB) à base de phosphonate de zirconium pour proposer un nouveau mode d'accrochage d'oligonucléotides ou d'ADNc sur lame de verre. Nous avons précédemment établi qu'à partir d'acide octadécylphosphonique [$C_{18}H_{37}PO_3H_2$] et de sels de zirconium, il est possible de déposer des films LB réguliers sur des lames de microscope (Figure page suivante - stade 1).

Nous obtenons ainsi une surface à caractère métallique, constituée d'atomes de zirconium arrangés de manière régulière ; nous avons constaté que cette surface est très réactive, avec notamment une très forte affinité pour les groupes acide phosphonique $[P(O)(OH)_2]$. Nous avons ainsi montré qu'en solution diverses molécules portant ces fonctionnalités $P(O)(OH)_2$ venaient se greffer de façon covalente sur cette surface (auto-assemblage). Nous avons notamment pu immobiliser selon cette stratégie des porphyrines de manganèse pour préparer des films catalytiques¹. Ce travail est mené conjointement avec le groupe du professeur Daniel TALHAM (University of Florida, Gainesville, USA) dans le cadre d'un accord de coopération



CNRS/NSF (2000-2002).

Par analogie avec les résultats décrits ci-dessus, nous nous proposons dans le cadre de ce projet de greffer dans un premier temps sur ces films des oligonucléotides à terminaisons phosphate $[O-P(O)(OH)_2]$ (en 5' ou 3') (Figure - stade 2). Suivra ensuite une étape d'hybridation avec des oligonucléotides marqués avec une sonde fluorescente (Figure - stade 3). Le dépôt sera fait à l'aide d'un spotter (ESI : Engineering Services

¹ Travaux en cours de publication et C.M. NIXON, K. LE CLAIRE, F. ODOBEL, B. BUJOLI et D.R. TALHAM, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 965-976. Palladium porphyrin containing zirconium phosphonate Langmuir-Blodgett films.

Incorporation) et les analyses de fluorescence à l'aide d'un scanner (GSI Lunomics Inc. Corporation).

Une première étude de faisabilité a montré qu'un oligonucléotide de 24 bases phosphorylé en position 3' et marqué en position 5' par une sonde fluorescente CY3, s'ancre spontanément par simple spotting sur nos films de Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de zirconium. Par comparaison avec un oligonucléotide identique non phosphorylé en 3', il apparaît que l'ancrage sur le film fait intervenir le phosphate terminal et que la fixation est stable dans les conditions standard de lavage des puces à ADN. Le programme de travail envisagé consiste à :

- Rechercher les conditions optimales de spotting et de lavage pour un ancrage spécifique d'oligonucléotides phosphorylés.
- Etudier l'influence de la position du phosphate en 3' ou 5' de l'oligonucléotide et de la présence ou non d'un bras espaceur.
- Etudier les limites de la stabilité de ce mode d'ancrage dans différentes conditions d'hybridation. Ce type d'assemblage phosphonate/phosphate de zirconium que nous proposons serait *a priori* suffisamment résistant pour envisager une réutilisation du support après usage, en effectuant un désappariement par traitement aqueux à chaud.
- Observer par microscopie à force atomique la qualité des dépôts.
- Adapter ces conditions de spotting à la préparation de puces contenant des ADN de plus grande taille (ADNc). Dans le cadre d'une collaboration avec l'unité INSERM 533, nous pourrions en particulier sélectionner des oligonucléotides correspondant à des gènes d'intérêt pour l'étude de pathologies cardiaques. Ces gènes ont des expressions différentielles dans diverses cardiomyopathies. Il serait intéressant de développer des puces de deuxième génération avec des gènes pertinents et des méthodes plus sensibles de détection avec des applications dans le cadre de biopsies endocavitaires que l'on obtient après des transplantations cardiaques.